

HELICOBACTER PYLORI KLİNİK İZOLATLARINDA *cagA* PREVALANSININ BELİRLENMESİ

DETECTION OF *cagA* PREVALENCE IN CLINICAL ISOLATES OF *HELICOBACTER PYLORI*

Zeynep SARIBAŞ¹, Hülya DEMİR², İnci Nur SALTİK TEMİZEL², Halis ŞİMŞEK³,
Hasan ÖZEN², Yakut AKYÖN¹

¹ Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara. (yakyon@hacettepe.edu.tr)

² Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, Gastroenteroloji, Hepatoloji ve Beslenme Ünitesi, Ankara.

³ Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Gastroenteroloji Ünitesi, Ankara.

ÖZET

Helicobacter pylori, gram-negatif, mikroaerofilik, insan gastrik mukozasında kolonize olan ve dünya nüfusunun ortalama %50'sini etkileyen bir bakteridir. Gastrik ülser, duodenal ülser, kronik atrofik gastrit, mukoza ile ilişkili lenfoid doku lenfoması ve mide adenokarsinomunda etyolojik ajan olarak sorumlu tutulmaktadır. Bakterinin önemli bir virülans faktörü olan *cagA* (cytotoxin-associated gene A) geni, 120-145 kDa ağırlığında bir protein olan ve hücre transformasyonuna yol açabilen CagA (sitotoksin ilişkili gen A) antijenini kodlamaktadır. *cagA* pozitif *H.pylori* suşlarının prevalansı coğrafi bölgelere ve hastaların yaş grubuna göre değişiklik gösterebilmektedir. Son yıllarda yapılan çalışmalar, *cagA* pozitif *H.pylori* suşlarının gastrik karsinom gelişiminde rol oynadığını düşündürmektedir. Bu çalışmada, erişkin ve çocuk hastalardan izole edilen klinik *H.pylori* izolatlarında *cagA* prevalansının belirlenmesi amaçlanmıştır. Çalışmaya, 1997-2003 yılları arasında Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalında biyopsi örneklerinden izole edilen ve gastrointestinal patoloji saptanmış 107'si erişkin, 91'i çocuk hastaya ait toplam 198 stok *H.pylori* suşu dahil edilmiştir. İzolatlardan DNA ekstraksiyonu, setil trimetil amonyum bromür (CTAB) yöntemi ile yapılmış ve *H.pylori cagA* geninin 348 baz çiftlik bölgesi, F1 ve B1 (Gen Bankası no: L11714 pozisyon 1231 ve 1578R) primerleri kullanılarak "in house" polimeraz zincir reaksiyonu ile çoğaltılmıştır. Çalışmamızda, klinik *H.pylori* izolatlarında *cagA* geni pozitifliği toplam olarak %58.6 (116/198) oranında tespit edilmiş; erişkin hasta izolatları için *H.pylori cagA* pozitiflik oranı %62 (66/107), çocuk hasta izolatları için ise %55 (50/91) olarak belirlenmiştir. Üniversite hastanemizde *H.pylori* klinik izolatlarında *cagA* prevalansını belirleyen bu çalışmanın verileri, gelişmiş ülkelerden bildirilen sonuçlarla uyumlu bulunmuştur.

Anahtar sözcükler: *Helicobacter pylori*, *cagA*, polimeraz zincir reaksiyonu.

ABSTRACT

Helicobacter pylori is a gram-negative, microaerophilic bacterium that colonizes human gastric mucosa and affects approximately 50% of the whole world population. It has put the blame on gastric ul-

cer, duodenal ulcer, chronic atrophic gastritis, mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma and stomach adenocarcinoma, as the etiological agent. The *cagA* (cytotoxin-associated gene A) gene which is one of the most important virulence factors of *H.pylori*, encodes a 120-145 kDa protein called CagA antigen that may cause cell transformation. The prevalence of *cagA* positive *H.pylori* infections varies according to geographical area and age of the patients. Recent studies have suggested that *cagA* positive *H.pylori* strains play a role in the development of gastric carcinoma. The aim of this study was to evaluate the prevalence of *cagA* positive *H.pylori* isolates in adult and pediatric patient groups in Hacettepe University, Faculty of Medicine. The study was performed on 198 *H.pylori* stocked strains which have been isolated between 1997-2003 period from biopsy specimens of 107 adult and 91 pediatric patients with gastrointestinal pathology. Chromosomal DNA was extracted by the cetyltrimethyl-ammonium bromide (CTAB) method, and a 348 bp region of the *cagA* gene was amplified by an "in-house" polymerase chain reaction (PCR) using F1 and B1 primers (Gene Bank number: L11714 position 1231 and 1578R). The evaluation of PCR products revealed that 58.6% (116/198) of the isolates were *cagA* positive. The rates of *cagA* positive *H.pylori* among the adult and pediatric isolates were 62% and 55%, respectively. The present study demonstrates the prevalence of *cagA* in clinical isolates of *H.pylori* in our university hospital, and our data was found concordant with the results of studies reported from developed countries.

Key words: *Helicobacter pylori*, *cagA*, polymerase chain reaction.

GİRİŞ

Helicobacter pylori, mikraerofilik, sarmal şekilli gram-negatif bir bakteridir. *H.pylori* enfeksiyonu yaygın olarak görülen kronik bir enfeksiyon olup, dünya nüfusunun yaklaşık yarısının *H.pylori* ile kolonize olduğu bildirilmektedir¹. *H.pylori* izolasyon oranı gelişmekte olan ülkelerde %70-90 iken, bu oran gelişmiş ülkelerde %25-50 arasında değişmektedir². Primer olarak insan mide mukozasında kolonize olan *H.pylori* için bulaş yolları tam olarak açıklık kazanmamıştır. En yaygın geçiş yolu, insandan insana fekal-oral, oral-oral ve gastrik-oral yoldur. *H.pylori* enfeksiyonunu takiben inflamatuvar yanıt olarak gastrit gelişebilir. Buna ek olarak *H.pylori*, gastrik ülser, duodenal ülser, mukoza ile ilişkili lenfoma ve gastrik kanser etyolojisinde de suçlanmaktadır. *H.pylori*, toplumlarda %25-90 gibi yüksek oranlarda görülmesine karşın, ortaya çıkan gastrointestinal patolojilerin daha düşük sıklıkta olması, bakterinin virülans faktörlerine ve konağa ait faktörlere bağlanabilir¹.

CagA (cytotoxin-associated gene A) proteini, *H.pylori*'nin önemli bir virülans faktörü olarak kabul edilmektedir. *cagA* geni, cag patojenite adasının ucunda bulunan 40 kb'lık DNA parçasıdır. Yatay (horizontal) geçişle kazanılan bu gen CagA antijenini kodlar³. *H.pylori* mide hücresine tutunduktan sonra, CagA proteini, tip IV sekresyon sistemiyle hücre içine enjekte edilir. Burada Src kinazlarla tirozin fosforilasyonuna uğrar; böylece bakteri sinyal iletimi bozulur. Hücresel disfonksiyon ve transformasyon meydana gelir. *cagA* pozitif *H.pylori* ile enfekte olan kişilerde gastrik adenokarsinom gelişme olasılığının daha fazla olduğu ileri sürülmektedir³. Bu temele dayanarak, Uluslararası Kanser Ajansı ve Dünya Sağlık Örgütü, *H.pylori*'yi sınıf 1 karsinojen olarak belirlemişlerdir. Tüm dünyada 1-2. sırada görülen neoplazma olarak rapor edilen gastrik adenokarsinomun etyolojisinin *H.pylori* ve özellikle *cagA* pozitif *H.pylori* suşları ile ilişkili bulunması, bu kanserin önlenmesi yolundaki çalışmalarını artırmıştır.

Bu çalışmada, erişkin ve çocuk hastalardan izole edilen klinik *H.pylori* izolatlarında *cagA* prevalansının belirlenmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmaya, 1997-2003 yılları arasında Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalında endoskopik biyopsi örneklerinden izole edilmiş olan ve stok besiyerinde -80°C'de saklanan toplam 198 *H.pylori* suşu dahil edildi. Gastrointestinal patoloji saptanmış 107'si erişkin, 91'i ise çocuk hastaya ait bu klinik izolatlar, kültür, Gram boyama, üreaz ve katalaz testleriyle *H.pylori* olarak tanımlanmıştı.

İzolatların DNA ekstraksiyonları, setil trimetil amonyum bromür (CTAB) yöntemi uygulanarak gerçekleştirildi⁴. Elde edilen DNA'lardan *H.pylori cagA* geninin 348 baz çifti (bç)'lik bölgesi, polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile çoğaltıldı. Bu amaçla, F1 (5' GAT AAC AGG CAA GCT TTT GAG G 3') ve B1 (5' CTG CAA AAG ATT GTT TGG CAG A3') (Gen Bankası no: L11714 pozisyon 1231 ve 1578R) primerleri kullanıldı. Amplifikasyon için 95°C'de 5 dakika denatürasyonu takiben, 94°C'de 30 saniye, 55°C'de 1 dakika, 72°C'de 2 dakika olacak şekilde 35 döngü ve 72°C'de 5 dakika olarak gerçekleştirildi. Her PCR'de pozitif kontrol olarak *H.pylori* NCTC 11637 ve negatif kontrol olarak da steril distile su kullanıldı. Elde edilen tüm PCR ürünleri %1.3 agaroz jel elektroforeziyle ayrıştırıldı. Jel etidyum bromürle boyanıp distile suyla yıkanarak fazla boyadan arındırıldıktan sonra ultraviyole ışık kaynağı üzerinde incelendi.

BULGULAR

Çalışmamızda, toplam 198 *H.pylori* klinik izolatının 116 (%58.6)'sında PCR ile *cagA* geni varlığı saptanmıştır. *H.pylori cagA* pozitiflik oranı erişkin hasta izolatları için %62 (66/107), çocuk hasta izolatları için ise %55 (50/91) olarak belirlenmiştir.

TARTIŞMA

Tüm dünya nüfusunun yaklaşık %50'sinin *H.pylori* ile enfekte olduğu bildirilmektedir. Bu yüksek prevalansa karşılık *H.pylori*'ye bağlı gastrointestinal hastalıkların görülme oranı daha düşüktür⁵. Bununla birlikte, duodenal ülser, gastrik ülser, gastrik kanser ve gastrik lenfoma görülen çoğu olgunun *H.pylori* ile enfekte olduğu belirtilmektedir¹. *H.pylori*'nin önemli virülans faktörleri arasında üreaz enzimi, vakuolizasyon toksini (vacuolating cytotoxin A; VacA) ve CagA proteini yer alır. Son yıllardaki çalışmalar, virülans faktörlerinin varlığı ile klinik tablolar arasındaki ilişkinin araştırılması üzerinde yoğunlaşmıştır.

CagA proteini *H.pylori* suşlarının %60-80'inde ve genellikle de VacA ile birlikte bulunmaktadır⁶⁻⁸. *cagA* geni ile gastrointestinal patolojilerin ilişkilendirildiği çalışmalar olduğu gibi, ilişki kurulamayan çalışmalar da vardır⁷⁻¹⁵. *H.pylori* prevalansı belirli yaş gruplarında ve coğrafi bölgelerde farklılık göstermektedir. Gunn ve arkadaşlarının⁷ yaptığı çalışmada, 120 *H.pylori* izolatının 91 (%76)'inde *cagA* geni saptanmış ve bu suşlarla enfekte hastalarda artmış inflamatuvar yanıt ve daha yoğun kolonizasyon görülmüştür. Ayrıca, *cagA* pozitif izolatlar ile gastroduodenal ülserasyon arasında da pozitif ilişki kurulmuştur⁷.

Batı ülkelerinde yapılan birçok çalışmada, *cagA* pozitif suşlarla gastroduodenal patoloji arasında ilişki saptanırken, yüksek *cagA* gen prevalansının görüldüğü coğrafi bölgelerde bu gen, patojeniteyi belirlemede yol gösterici olamamaktadır^{5,9,10}. Kim ve arkadaşlarının⁵ çalışmasında, 208 ve 349 bç'lik *cagA* bölgeleri araştırılmış ve sırasıyla %96.1 ve %97.4 oranlarında pozitiflik bildirilmiştir. Araştırmacılar, bu kadar yüksek *cagA* oranının patojen olan ve olmayan *H.pylori* izolatları arasında ayırım için kullanılamayacağını belirtmişlerdir⁵. Zheng ve arkadaşları⁹ *cagA* ile peptik ülser arasındaki ilişkiyi araştırdıkları çalışmalarında, 108 *H.pylori* izolatının 95'inde *cagA* genini saptamışlar; *cagA* pozitiflik oranını peptik ülserli hastalarda %86.6, peptik ülseri olmayanlarda ise %90.2 olarak bulmuşlar ve sonuç olarak virülans faktörlerinin gastrointestinal patoloji gelişiminde etkili olmayabileceğini, konak-patojen arası ilişkinin daha önemli olduğunu ileri sürmüşlerdir⁹. Maeda ve arkadaşları¹⁰, gastrointestinal hastalıklardan bağımsız olarak *cagA* pozitiflik oranını %90 olarak saptamışlar ve Japon izolatlarının çoğunda *cagA* geninin bulunduğunu, bu nedenle gastrointestinal hastalıkların gelişiminde bu genin bir belirteç olarak kullanılamayacağını belirtmişlerdir.

Ülkemizde Nagiyev ve arkadaşlarının¹¹ yaptığı çalışmada %84.1 oranında tip 1 *H.pylori* klinik izolatı saptanırken; Sarıbaşak ve arkadaşlarının¹² çalışmasında *H.pylori* izolatlarının %78'inde *cagA* geni pozitif olarak bildirilmiştir. Bizim çalışmamızda da, erişkin hasta grubunda *cagA* pozitiflik oranı %62 olarak saptanmıştır.

H.pylori izolatlarında *cagA* pozitifliği yaş gruplarına göre de farklılık göstermektedir. Alarcon ve arkadaşlarının¹³ çalışmasında *H.pylori* izolatlarında *cagA* pozitiflik oranı 0-10 yaş arasında %23.8-28.6; 11-20 yaş arasında %30-40; 21-40 yaş arasında %70.6; 41-60 yaş arasında %70.9 ve 61-78 yaş arasında %44 olarak belirtilmiştir. Saltık ve arkadaşlarının¹⁴ pediatrik hastalarda yaptıkları çalışmada ise *cagA* prevalansı %55.6 olarak saptanmış; gastroduodenal lezyonlar ile *cagA* arasında bir ilişki bulunmamıştır. Pediatrik yaş grubunda yapılan diğer bir çalışmada da *H.pylori* klinik izolatlarında *cagA* pozitiflik oranı %74.4 olarak saptanmıştır¹⁵. Bizim çalışmamızda bu oran %55 olarak belirlenmiştir.

Sonuç olarak çalışmamızda, gastrointestinal patolojisi olan *H.pylori* ile enfekte kişilerde *cagA* geninin toplam pozitiflik oranı %58.6 olarak saptanmıştır. Bu veri, üniversite hastanemizdeki prevalansın bilinmesi ve gelişebilecek gastroduodenal patolojilerin önlenmesi açısından önemlidir. Ancak yine de gastroduodenal patoloji sonuçlarıyla *cagA* pozitif *H.pylori* suşları arasındaki ilişkinin araştırıldığı daha kapsamlı klinik çalışmalara gereksinim vardır.

KAYNAKLAR

1. Marshall B. *Helicobacter pylori*: 20 years on. Clin Med 2002; 2: 147-52.
2. Komoniewska-Radosz H, Bek T, Jozwiak J, Martirosan G. Pathogenicity of *Helicobacter pylori* infection. Clin Microbiol Infect 2005; 11: 602-10.
3. Hatakeyama M, Higashi H. *Helicobacter pylori* CagA: a new paradigm for bacterial carcinogenesis. Cancer Sci 2005; 96: 835-43.
4. Wilson K. Preparation of genomic DNA from bacteria. Curr Protoc Mol Biol 2001; Chapter 2: Unit 2.4.

5. Kim SY, Woo CW, Lee YM, et al. Genotyping *cagA*, *vacA* subtype, *ice A1*, and *babA* of *Helicobacter pylori* isolates from Korean patients, and their association with gastroduodenal diseases. J Korean Med Sci 2001; 16: 576-84.
6. Lage AP, Godfroid E, Fauconnier A, et al. Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection by PCR: comparison with other invasive techniques and detection of *cagA* gene in gastric biopsy specimens. J Clin Microbiol 1995; 33: 2752-6.
7. Gunn MC, Stephens JC, Stewart JA, Rathbone BJ, West KP. The significance of *cagA* and *vacA* subtypes of *Helicobacter pylori* in the pathogenesis of inflammation and peptic ulceration. J Clin Pathol 1998; 51: 761-4.
8. Francesco VD, Margiotta M, Zullo A, et al. Claritromycin resistance and *Helicobacter pylori* genotypes in Italy. J Microbiol 2006; 44: 660-4.
9. Zheng PY, Hua J, Yeoh KG, Ho B. Association of peptic ulcer with increased expression of Lewis antigens but not *cagA*, *iceA*, and *vacA* in *Helicobacter pylori* isolates in an Asian population. Gut 2000; 47: 18-22.
10. Maeda S, Ogura K, Yoshida H, et al. Major virulence factors, VacA and CagA, are commonly positive in *Helicobacter pylori* isolates in Japan. Gut 1998; 42: 338-43.
11. Nagiyev T, Yula E, Abayli B, et al. Prevalence and genotypes of *Helicobacter pylori* in gastric biopsy specimens from patients with gastroduodenal pathologies in the Cukurova region of Turkey. J Clin Microbiol 2009; 47: 4150-3.
12. Saribasak H, Salih BA, Yamaoka Y, et al. Analysis of *Helicobacter pylori* genotypes and correlation with clinical outcome in Turkey. J Clin Microbiol 2004; 42: 1648-51.
13. Alarcon T, Domingo D, Martinez MJ, et al. *cagA* gene and *vacA* alleles in Spanish *Helicobacter pylori* clinical isolates from patients of different ages. FEMS Immunol Med Microbiol 1999; 24: 215-9.
14. Saltık İN, Demir H, Engin D, et al. The *cagA* status of *Helicobacter pylori* isolates from dyspeptic children in Turkey. FEMS Immunol Med Microbiol 2003; 36: 147-9.
15. Sökücü S, Ozden AT, Süoğlu OD, et al. CagA positivity and its association with gastrointestinal disease in Turkish children undergoing endoscopic investigation. J Gastroenterol 2006; 41: 533-9.